2005 年 9 月 作成

2005 年 11 月 改訂

モリナガ FASPEK 特定原材料測定キット

操作マニュアル

株式会社　森永生科学研究所

〒236-0003　横浜市金沢区幸浦 2-1-16

※取扱説明書と併用してご活用下さい。

【はじめに】

モリナガ FASPEK 特定原材料測定キットは、従来のモリナガ特定原材料測定キットの使いやすさを踏襲しつつ、新開発された抽出液の採用により、従来キットと比較し、食品中の特定原材料タンパク質をより高い回収率で測定できる新製品です。そのため、従来のキットで偽陰性を示す可能性が高いとされていた缶詰、レトルトパウチ食品、焼き菓子のような食品に対しても回収率が大幅に向上しました。
2005 年 10 月、モリナガ FASPEK 特定原材料測定キットは通知法に指定されました。

【モリナガ特定原材料測定キット】

- 卵測定キット（卵白アルブミン）
- 牛乳測定キット（β-ラクトグロブリン）
- 牛乳測定キット（カゼイン）
- 小麦測定キット（グリアジン）
- そば測定キット
- 落花生測定キット

【キットの特徴】

1. 抽出液に界面活性剤と還元剤を加えることで、従来のキットに比べタンパク質を高回収率で測定可能
2. 簡単な操作で測定可能（マイクロプレートを使用したサンドイッチ ELISA 法）
3. 短時間で測定可能（2 時間弱）
4. 高感度で測定可能（特定原材料総タンパク質として 0.78ng/mL から）
5. 試料中の特定タンパク質を検出（特定タンパク質に対する抗体を使用）

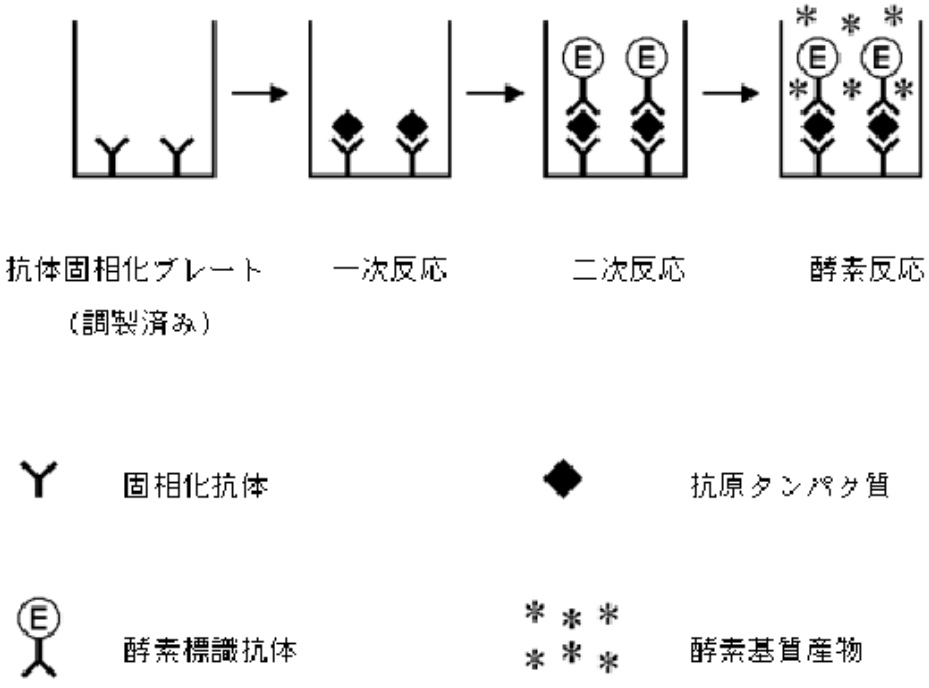
【測定原理】

一次反応：試料中の抗原タンパク質が、プレート上の固相化ポリクローナル抗体に結合し、
［固相化抗体/抗原タンパク質］の複合体を形成します。

二次反応：酵素標識ポリクローナル抗体が複合体上の抗原タンパク質に結合します。

酵素反応：酵素基質溶液を加えると、プレート上の抗原・抗体複合体に結合した酵素により
呈色します。
得られた吸光度に対応する特定原材料濃度を標準曲線から算出します。

〈測定原理図〉



【測定する際の注意事項】

1. キットの試薬にはアレルゲン性を有する特定原材料やウシ血清アルブミンを使用しています。これらのタンパク質にアレルギーのある方は本キットを使用する際には試薬の取扱いに十分に注意し、慎重に測定操作を行って下さい。
2. 試薬は全て室温（20-25℃）に戻してから使用して下さい。
3. 測定は二重以上の測定で行って下さい。
4. 反応時間、反応温度（室温：20-25℃）は厳守して測定して下さい。
5. 標準溶液および検体を分注する際、ピペッティング容量にばらつきが生じないよう注意して下さい。ピペットマン等のピペッティング器具は、定期的に検定して下さい。
6. 実験に用いる器具類は汚染が無いよう、使用前に十分洗浄して下さい。吸光度のバラツキや、バックグラウンドの上昇の原因になります。検体希釈液の調製には使い捨てのプラスチックピペットや使い捨てチューブなどを使用すると、汚染の影響を低減することができます。またウェルへの分注の際に用いるピペットチップはフィルター付きのものをお勧めします。
7. 本キットによる測定は非常に高感度なため、測定は埃などが除去された清潔な環境で行って下さい。汚染を防ぐため、マイクロプレート操作後は必ず付属のプレート用ふたをして下さい。口や手からの混入を防ぐため、実験中はマスクや使い捨てのプラスチック手袋等を着用することをお勧めします。
8. 各反応終了後の洗浄操作は非常に重要です。洗浄が不十分だと、バックグラウンドが高くなる可能性があります。ウェル内に液が残存していないことを十分確認しながら洗浄操作を行って下さい。アスピレーションによって液を除いたり、ペーパータオルなどを使用してマイクロプレートをよく叩いて内容液を除いて下さい。洗浄後は速やかに次の試薬を分注して下さい。
9. 酵素反応は遮光下で行って下さい。
10. プレートの底はなるべく触れないようにして下さい。もし指紋等で底面が曇った場合は十分に拭き取ってから吸光度を測って下さい。汚れで吸光度が正しく測定できない場合があります。
11. 反応停止液に１N 硫酸を使用していますので、手や目、粘膜、衣服等に付かないようご注意下さい。誤って付着した場合はただちに大量の流水で洗い流して下さい。また、医師の指示に従って下さい。
12. 本キットは高濃度の還元剤を含むため、ご使用の際特有の臭気を感じることがあります。そのため、検体の抽出・調製の際にはドラフトの使用をお勧めします。さらに、測

定時にプレートをラップで覆うことにより臭気が軽減されます。

【使用方法】

〈検体調製・抽出のフローチャート〉

（試料の均質化）　□ 食品検体をフードカッター等で粉砕均質化
↓
（抽出）　□ 均質化した検体 1g を秤量
↓
□ 検体抽出液 19mL を加えて一晩往復振盪
↓
（遠心分離）　□ 3,000×g で 20 分間室温で遠心分離
↓
（抽出液）　□ 検体抽出液（上清もしくはろ過液）

〈測定のフローチャート〉

（検体の準備）　□ 検体希釈液Ⅰ、Ⅱ、洗浄液を調製し、標準溶液、および測定溶液を準備
↓
（一次反応）　□ 標準溶液、測定溶液（100μL/ウェル）*二重測定以上
↓
□ 一次反応（室温、1 時間）
↓
（二次反応）　□ 洗浄（250-300μL、6 回）
↓
□ 酵素標識抗体溶液（100μL/ウェル）
↓
□ 二次反応（室温、30 分）
↓
（酵素反応）　□ 洗浄（250-300μL、6 回）
↓
□ 酵素基質溶液（100μL/ウェル）
↓
□ 酵素反応（室温、10 分）　*酵素反応中はプレートを遮光
↓
（反応停止）　□ 反応停止液（100μL/ウェル）
↓
（測　定）　□ 吸光度測定（主波長：450nm、副波長：600～650nm）

【試薬の調製法】

1. 固相化モジュールの準備

A 抗体固相化モジュールをアルミパウチから出さず室温に戻し、その後開封して下さい。

開封後は直ちに使用して下さい。

2. 標準液の調製

B 標準品 を下記に示すように検体希釈液Ⅱ（「6. 検体希釈液Ⅱの調製」参照」を用いて、25 ng/mL から 0.78 ng/mL の希釈系列を調製します。

ブランク（0ng/mL）は検体希釈液Ⅱを用います。

最終濃度(ng/mL)	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78
標準原液(50ng/mL) =	500	500	500	500	500	500
検体希釈液（μL）	500	500	500	500	500	500

※標準溶液の希釈は用時調製して下さい。また、測定毎に検量線を作成して下さい。

3. C、D、E の試薬はそのまま使用します。

C 酵素標識抗体溶液

D 酵素基質溶液

E 反応停止液

4. 検体抽出液の調製

F 検体希釈液を 20 倍に、H 抽出用 A 液を 20 倍に、I 抽出用 B 液を 20 倍になるように合わせて精製水で希釈し検体抽出液とします。もしくは F 検体希釈液、H 抽出用 A 液、I 抽出用 B 液、精製水を 1:1:1:17 の比率で混合します。必要量を調製して下さい。

※ H 抽出用 A 液は冷却下で沈殿するため、加温溶解してからご使用下さい。溶解後は室温で保存可能です。

※ 本溶液は検体の抽出に使用します。

（例：24 検体測定する場合）

F 検体希釈液（20倍濃縮液）	・・・・・・	25mL
H 抽出用A液（20倍濃縮液）	・・・・・・	25mL
I 抽出用B液（20倍濃縮液）	・・・・・・	25mL
精 製 水	・・・・・・	425mL
		500mL

5. 検体希釈液Ⅰの調製

F 検体希釈液を精製水で 20 倍に希釈します。必要量を調製して下さい。

※ 検体希釈液Ⅱの調製及びろ液の希釈に用います。

（例：24 検体測定する場合）

F 検体希釈液（20倍濃縮液）	・・・・・・	25mL
精 製 水	・・・・・・	475mL
		500mL

6. 検体希釈液Ⅱの調製

上記 4.で調製した検体抽出液を上記 5.で調製した検体希釈液Ⅰで 20 倍に希釈します。必要量を調製して下さい。

※ 標準溶液の調製及び検体の再希釈に用います。

（例：24 検体測定する場合）

検体抽出液	・・・・・・	25mL
検体希釈液Ⅰ	・・・・・・	475mL
		500mL

※ 使用する検体希釈液を分類すると以下のようになります。

	標準溶液の希釈	検体抽出液の希釈	検体抽出液の再希釈
検体希釈液Ⅰ		○	
検体希釈液Ⅱ	○		○

7. 洗浄液の調製

G 洗浄液（20 倍濃縮液）を精製水で 20 倍に希釈し、必要量を調製して下さい。

※ 洗浄操作には調製済み洗浄液を使用します。

【検体の調製法・抽出法】

1. 食品検体が均質になるようにミキサー等で粉砕します。

2. 均質化された検体 1g をプラスチック製 50mL 容遠心管に 取り、検体抽出液 19mL(「4. 検体抽出液の調製」参照）を加えよく振り混ぜて混合し、固形分を均等に分散させます。
3. 遠心管を横にして振とう機で一晩（12 時間以上)振とうしながら抽出します。（90～110 往復ストローク/分, 振とう幅 3cm 程度）
4. 抽出液の pH を確認し,必要であれば中性付近（pH 6.0～8.0）になるよう調整します。（pH 試験紙で構いません）

5. 3,000×g で 20 分間室温で 遠心分離し、上清を分取します。沈査が得られない場合は上清を濾紙で濾過します。

※冷却下で遠心分離を行うと抽出液組成物が沈殿するおそれがあるため、室温で遠心分離を行います。

6. 上清またはろ過液を検体希釈液Ⅰ（「5. 検体希釈液Ⅰの調製」参照）を用い 20 倍に希釈し、測定溶液とします。

7. 更に希釈して測定する場合は、検体希釈液Ⅱ（「6. 検体希釈液Ⅱの調製」参照）を用いて希釈します。

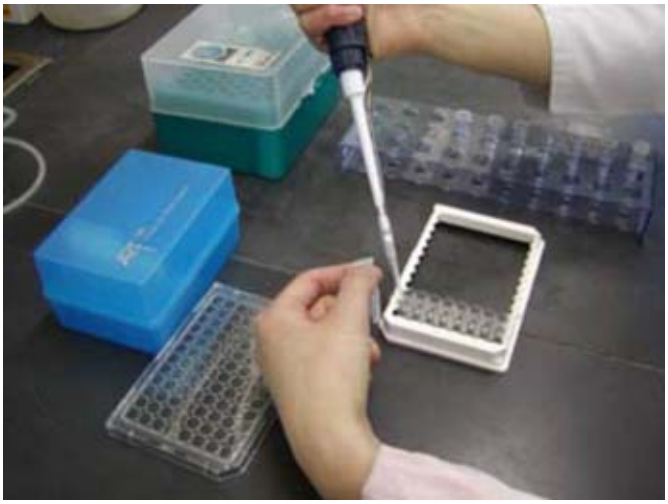
※必ず検体希釈液Ⅰで 20 倍希釈したものを測定溶液として用いて下さい。

【測定法】

試薬は全て室温に戻してから使用して下さい。

（一次反応）

1. A 抗体固相化モジュールをアルミパウチを開封せず室温に戻した後、付属のモジュール用フレームに必要量をセットします。
2. 各ウェルに標準溶液または測定溶液を 100μL ずつ分注します。



3. 軽く振とうし、付属のモジュール用フタをして室温で正確に 1 時間静置して反応させます。

（二次反応）

1. アスピレーション等によりウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 250-300μL ずつの洗浄液で洗浄します。この操作を 6 回繰り返します。

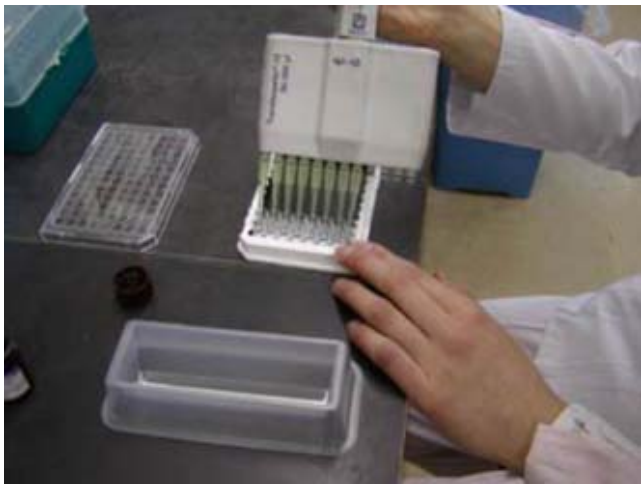
※洗浄には 8 連マルチチャンネルピペットの使用、手動型エライザ用洗浄機、プレートウ

オッシャーの使用を推奨します。

2. C 酵素標識抗体溶液を各ウェルに 100μL ずつ分注します。
3. 軽く振とうし、マイクロプレートにフタをして室温で正確に 30 分間静置して反応させます。

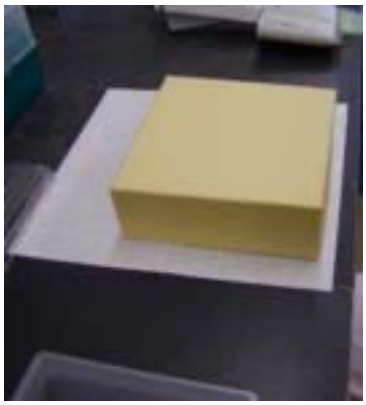
（酵素反応）

1. アスピレーション等によりウェル内の溶液を完全に除去し、各ウェルあたり 250-300μL ずつの洗浄液で洗浄します。この操作を 6 回繰り返します。
2. D 酵素基質溶液を各ウェルに 100μL ずつ分注します。



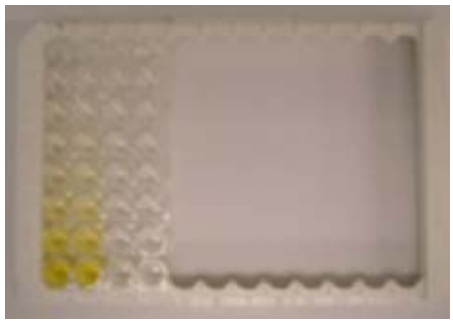
3. フタをして室温遮光下で正確に 10 分間静置して反応させます。

※ 酵素反応は遮光下で行って下さい。



4. E 反応停止液を各ウェルに 100μL ずつ分注し酵素反応を停止させます。

発色



反応停止

※ 酵素基質溶液を加えると青色に呈色します。また反応停止液を加えると黄色に変化します。

5. プレートリーダーを用い主波長 450nm、副波長 600-650nm の条件で吸光度を測定します。

※ 酵素反応停止後は 30 分以内に吸光度を測定して下さい。

6. 標準溶液の吸光度より標準曲線を作成し、食品検体中の特定原材料タンパク質の濃度を求めます。

① 測定した各ウェルの吸光度の平均値を算出します。

② 片対数方眼紙を用い、標準溶液の濃度を横軸に、吸光度を縦軸にプロットし、標準曲線を作成します。グラフ描画ソフトウェアを用いて標準曲線を算出する場合は、4 係数 logistic 解析 を使用することをお勧めします。

③ 標準曲線より各測定溶液の濃度を読み取ります。

④ 測定溶液の吸光度が、標準曲線の吸光度より高い場合は、検体希釈液Ⅱでさらに希釈して、再度測定して下さい。

※通知法に従う場合は、4 係数 logistic 解析を行って下さい。

測定溶液の濃度（ng/mL）と検体中の特定原材料総タンパク質濃度 ppm（μg/g）の関係は

ppm =［ng/mL］×**20**（抽出時の希釈倍率）× **X**（希釈時の希釈倍率）÷**1000**

の式で求められます。